

## Notas Científicas

### Transformação genética de laranja 'Valência' com o gene *cecropin* MB39

Luis Gustavo de Paoli<sup>(1)</sup>, Raquel Luciana Boscariol Camargo<sup>(2)</sup>, Ricardo Harakava<sup>(3)</sup>, Beatriz Madalena Januzzi Mendes<sup>(2)</sup> e Francisco de Assis Alves Mourão Filho<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Av. Pádua Dias, nº 11, Caixa Postal 9, CEP 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: lgpaoli@esalq.usp.br, famourao@esalq.usp.br <sup>(2)</sup>Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Av. Centenário, nº 303, Caixa Postal 96, CEP 13400-970 Piracicaba, SP. E-mail: raquel@centrodecitricultura.br, bmendes@cena.usp.br <sup>(3)</sup>Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, nº 1.252, CEP 04014-002 São Paulo, SP. E-mail: harakava@biologico.sp.gov.br

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi obter plantas transgênicas de laranja 'Valência' com o gene *cecropin* MB39 controlado pelo promotor do gene da fenilalanina-amônia-liase de citros, visando a expressão gênica específica nos vasos do xilema. A transformação genética foi realizada via *Agrobacterium tumefaciens* por meio do co-cultivo de segmentos de epicótilo. Onze plantas transgênicas foram identificadas por PCR, pela amplificação do fragmento esperado de 189 pb, as quais foram aclimatizadas em casa de vegetação. A integração do transgene foi confirmada em três plantas pela análise de transferência de Southern.

**Termos para indexação:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Citrus sinensis*, CVC, peptídeo antibacteriano, xilema.

### Genetic transformation of 'Valencia' sweet orange with the *cecropin* MB39 gene

**Abstract** – The objective of this work was to produce 'Valencia' sweet orange transgenic plants with the *cecropin* MB39 gene controlled by a phenylalanine ammonia-lyase gene promoter from citrus in order to direct gene expression in xylem vessels. The genetic transformation was mediated by *Agrobacterium tumefaciens* with the co-culture of epicotyl segments. Eleven transgenic plants were selected by PCR with the amplification of a 189 bp fragment, which were acclimatized to greenhouse. The integration of the transgene was confirmed in three plants by Southern blot analysis.

**Index terms:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Citrus sinensis*, CVC, antibacterial peptide, xylem.

A transformação genética de plantas constitui instrumento biotecnológico essencial para o melhoramento, pela introdução de genes exógenos, manutenção das características originais da variedade e encurtamento do tempo para obtenção de uma nova cultivar (Brasileiro & Dusi, 1999). O sistema de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Tows. Conn. tem sido eficiente na regeneração de plantas transgênicas de citros (Mendes et al., 2002; Petri & Burgos, 2005).

Na busca de resistência a patógenos de origem bacteriana, a expressão de genes de peptídeos antibacterianos é uma alternativa viável (Zasloff, 2002). A cecropina pertence a uma família de pequenos peptídeos, isolados da hemolinfa de *Hyalophora*

*cecropia* L., que exibem atividade lítica e antibacteriana contra muitas bactérias (Steiner et al., 1988).

Em experimentos in vitro, as cecropinas A e B reduziram o crescimento de *Xylella fastidiosa* Wells et al. (Andersen et al., 2004; Ishida et al., 2004). Entretanto, em alguns casos, o peptídeo foi degradado rapidamente, com perda de atividade. Dessa forma, o uso de análogos do gene, com estrutura mais estável, é estratégia mais adequada.

Harakava (2000) utilizou gene análogo da cecropina B, *cecropin* MB39, para construção de um vetor para transformação de plantas. Este gene análogo foi sintetizado por reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando-se quatro oligonucleotídeos de 62 a 68 bases, contendo os códons correspondentes aos aminoácidos

do peptídeo adicionado de sequência sinalizadora para secreção.

O peptídeo cecropina MB39 apresenta, em relação à cecropina B, substituição de uma metionina por uma valina, tornando-o mais resistente à ação de proteases de diferentes espécies vegetais (Owens & Heutte, 1997). Em virtude da maior estabilidade desse peptídeo à ação de enzimas da planta, este vetor tornou-se bom candidato no desenvolvimento de plantas cítricas transgênicas resistentes a *Xylella fastidiosa*, causadora da doença clorose variegada dos citros (CVC). Por sua vez, o uso de promotores que confirmam expressões dos genes em locais, tempo e intensidade específicos serão pré-requisitos em gerações de transgênicos futuras (Harakava, 2000).

Uma alternativa ao desenvolvimento de plantas cítricas transgênicas resistentes à *X. fastidiosa* é a utilização de promotores cuja expressão de genes ocorre, preferencialmente, nos vasos do xilema, local de colonização desse patógeno. O parênquima do xilema mostra alta atividade da enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL), a qual está envolvida na síntese de fenilpropanóides, precursores de lignina. O promotor do gene da PAL2, clonado de *Citrus sinensis*, variedade Madame Vinous, denominado CsPP, foi utilizado em plantas transgênicas de tabaco e citros, e demonstrou expressões do gene *GUS* no xilema e em células da epiderme de pecíolos (Azevedo et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi obter plantas transgênicas de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), via *Agrobacterium tumefaciens*, com o gene *cecropin* MB39 controlado pelo promotor do gene *PAL2* de citros (CsPP).

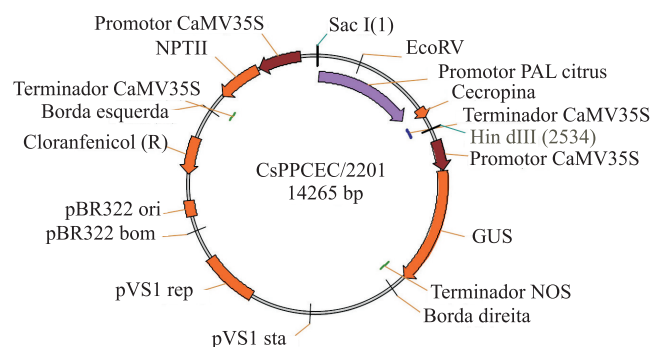
A estirpe de *A. tumefaciens* C58 foi utilizada. Essa estirpe contém o vetor binário CsPPCEC/2201 (Figura 1), derivado do vetor pCAMBIA 2201 (Harakava, 2000), o qual inclui o gene *cecropin* MB39, dirigido pelo promotor CsPP e o terminador NOS (nopalina sintase), o gene de seleção *nptII* e o gene repórter *GUS*, sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S. Os procedimentos para cultivo de *A. tumefaciens*, obtenção, seleção e preparo de explantes, e transformação genética de laranja 'Valência' incluíram protocolos anteriormente descritos (Mendes et al., 2002; Almeida et al., 2003).

Gemas adventícias regeneradas foram analisadas por PCR e microenxertadas em citrange 'Carrizo', e aclimatizadas em casa de vegetação. A eficiência de transformação foi calculada pelo número de plantas transgênicas obtidas a partir do número total de explantes (150)

utilizados na transformação. A análise da PCR incluiu o uso de primers específicos para a detecção do gene *cecropin* MB39 (CEC-F: 5' - ATG GGT AAG AAG TCT CAT ATT - 3' e CEC-R: 5' - TCA ACC CAA AGC CTT AG - 3') (Harakava, 2000).

A amplificação do fragmento de 189 pb foi realizada utilizando-se 2 µL de DNA (50–100 ng) extraídos de folhas pelo método CTAB (Doyle & Doyle, 1990), 0,2 µL de dNTPs (10 mM), 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µL de tampão (10X), 0,3 µL de *Taq* polimerase (5 U µL<sup>-1</sup>) e 0,3 µL dos primers (10 µM), em um volume de reação final de 20 µL. As reações foram realizadas em termociclador (PTC-100™, MJ Research, Inc.) com: 94°C/2 min, 40 ciclos de 94°C/15 s, 52°C/30 s, 72°C/30 s, e 72°C/4 min. As análises de transferência de Southern foram feitas para confirmação da integração do gene *nptII*, utilizando-se aproximadamente 60 µg de DNA extraídos de folhas, pelo método CTAB (Doyle & Doyle, 1990), modificado por uma lavagem adicional com fenol e uma com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).

O DNA foi digerido com a enzima de restrição *HindIII*, separado em gel de agarose (1%) por eletroforese e transferido para membrana de náilon (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences). A sonda para o gene *nptII* foi preparada por PCR e os fragmentos amplificados foram purificados e submetidos à marcação com o auxílio do kit 'AlkPhos Direct Labelling Reagents' (Amersham Biosciences). As hibridizações foram realizadas a 60°C e a reação de detecção foi feita com o kit CDP-Star Detection Reagent (Amersham Biosciences).



**Figura 1.** Esquema do vetor binário CsPPCEC/2201, contendo o gene *cecropin* MB39, dirigido pelo promotor *PAL2* de citros, o gene de seleção *nptII* e o gene repórter *GUS*, ambos sob controle do promotor CaMV35S.

A transformação e regeneração de plantas de laranja 'Valência' com o vetor CsPPCEC/2201 foi realizada com sucesso. Diversas gemas foram formadas, porém poucas se desenvolveram o suficiente para a microenxertia. No total, 15 plantas foram analisadas por PCR, o que resultou em 11 plantas transgênicas, com eficiência de transformação de 7,3%. A aclimatização do material em casa de vegetação foi realizada para cinco dessas plantas (Figura 2 A). A análise de transferência de Southern com sonda específica para o gene *nptII* confirmou a integração de pelo menos uma cópia do gene em três plantas transgênicas (Figura 2 B).

Embora algumas espécies já tenham sido transformadas (Montanelli & Nascari, 1991; Jaynes et al., 1993), não há relatos sobre plantas cítricas transgênicas para o gene *cecropin*, em especial quando dirigido por um promotor específico para xilema. Além disso, a maioria das plantas cítricas transgênicas produzidas em outros trabalhos contém promotores constitutivos (Almeida et al., 2003). O uso de promotores que conferem expressão em tecidos ou células específicas evita uma expressão desnecessária do gene e reduz a possibilidade de interferência no desenvolvimento da planta.

Além disso, essa expressão pode ser voltada aos tecidos colonizados pelo patógeno (Harakava, 2000). É o que ocorre no caso da bactéria *X. fastidiosa*, já que este patógeno coloniza os vasos do xilema.

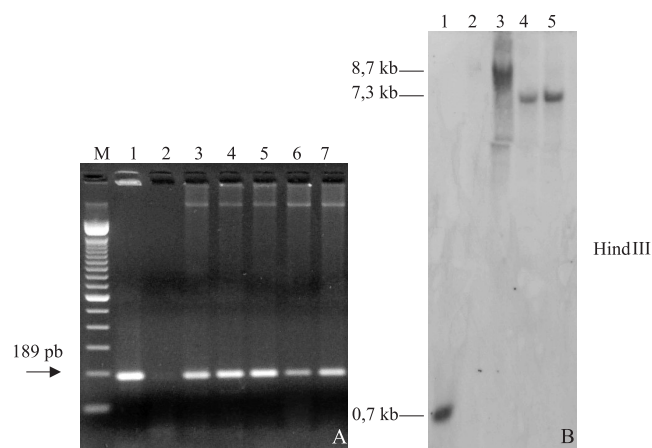
As plantas obtidas neste trabalho serão submetidas a análises de transferência de Northern, a fim de verificar níveis de transcrição do gene e, então, poderem ser propagadas e submetidas à inoculação da bactéria *X. fastidiosa*, de modo a analisar a resistência a este patógeno.

### Agradecimentos

À Fapesp e ao CNPq, pelo auxílio financeiro; à Capes, pela concessão de bolsa.

### Referências

- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PAVAN, A.; RODRIGUEZ, A.P.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. **Scientia Agricola**, v.60, p.23-29, 2003.
- ANDERSEN, P.C.; ISHIDA, M.L.; MOMOL, E.A.; BRODBECK, B.V.; LEITE, B.; MOMOL, M.T. Influence of *Vitis* xylem fluid plus cecropin on growth of *Xylella fastidiosa*. **Vitis**, v.43, p.19-25, 2004.
- AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; SCHINOR, E.H.; PAOLI, L.G.; MENDES, B.J.M.; HARAKAVA, R.; GABRIEL, D.W.; LEE, R.F. *GUS* gene expression driven by a citrus promoter in transgenic tobacco and 'Valencia' sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1623-1628, 2006.
- BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, SPI/CNPH, 1999. v.2. p.679-735.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- HARAKAVA, R. **Citrus variegated chlorosis: development of transgenic resistance and molecular studies of pathogenesis**. 2000. 70p. Thesis (Ph.D.). University of Florida, Gainesville.
- ISHIDA, M.L.; ANDERSEN, P.C.; LEITE, B. Effect of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay xylem fluid on cecropin B activity against *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.64, p.73-81, 2004.
- JAYNES, J.M.; NAGPALA, P.; DESTEFANO-BELTRAN, L.; HONG-HUNG, J.; KIM, J.; DENNY, T.; CETINER, S. Expression of a cecropin B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Science**, v.89, p.43-53, 1993.
- MENDES, B.M.J.; BOSCARIOL, R.L.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; ALMEIDA, W.A.B. *Agrobacterium*-mediated genetic



**Figura 2.** A) Análise da PCR com primers específicos para o gene *cecropin* MB39: M = marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen); 1, controle positivo (Vetor CsPPCEC/2201); 2, controle negativo (planta não-transgênica); 3 a 7, plantas transgênicas. B) Análise de transferência de Southern: 1, controle positivo (fragmento do gene *nptII* amplificado por PCR); 2, controle negativo (planta não-transgênica); 3 a 5, DNA das plantas transgênicas digeridas com *HindIII* e hibridizadas com sonda para o gene *nptII*.

- transformation of Hamlin sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.955-961, 2002.
- MONTANELLI, C.; NASCARI, G. Introduction of an antibacterial gene in potato (*Solanum tuberosum* L.) using a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*. **Journal of Genetics and Breeding**, v.45, p.307-316, 1991.
- OWENS, L.D.; HEUTTE, T.M. A single amino acid substitution in the antimicrobial defense protein cecropin b is associated with diminished degradation by leaf intercellular fluid. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, p.525-528, 1997.
- PETRI, C.; BURGOS, L. Transformation of fruit trees: useful breeding tool or continued future prospect? **Transgenic Research**, v.14, p.15-26, 2005.
- STEINER, H.; ANDREU, D.; MERRIFIELD, R.B. Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.939, p.260-266, 1988.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v.415, p.389-395, 2002.

---

Recebido em 9 de agosto de 2007 e aprovado em 17 de outubro de 2007